

jp10114800/pn

L1 ANSWER 1 OF 1 JAPIO (C) 2004 JPO on STN  
ACCESSION NUMBER: 1998-114800 JAPIO  
TITLE: POLYMER ADSORBED IMMUNOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE  
IMMOBILIZING STATIONARY PHASE  
INVENTOR: SAKAKI HIDEJIRO; SHIYUDOU KENSHIROU; YAMADA SATOSHI;  
KAZUHIKO  
MATSUYAMA KAZUO; NAKABAYASHI NORIO; ISHIHARA  
PATENT ASSIGNEE(S): NOF CORP  
NAKABAYASHI NORIO  
ISHIHARA KAZUHIKO  
KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN

PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC
***JP 10114800***	A	19980506	Heisei	C07K017-08

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT: JP 1996-271126 19961014  
ORIGINAL: JP08271126 Heisei  
PRIORITY APPLN. INFO.: JP 1996-271126 19961014  
SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN (CD-ROM), Unexamined  
Applications, Vol. 1998  
INT. PATENT CLASSIF.:  
MAIN: C07K017-08  
SECONDARY: G01N033-543  
ADDITIONAL: C07K016-00

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject solid phase useful for clinical diagnosis, capable of suppressing nonspecific adsorption and carrying out measurement excellent in sensitivity and reproducibility, by adsorbing a phosphorylcholine group- containing polymer on a stationary phase prepared by immobilizing an immunologically active substance to a carrier.  
SOLUTION: A phosphorylcholine group-containing polymer of the formula (R<SP>1</SP> is a 1-10C hydrocarbon group) composed of a polymer obtained by polymerizing a polymerizable component containing 2-methacryloyloxyethyl-2'-(trimethyl ammonio)ethyl phosphate is adsorbed on an immunologically active substance immobilized stationary phase prepared by immobilizing an immunologically active substance (e.g. antibody) to a carrier (e.g. titer plate made of polystyrene) to give the objective polymer absorbing immunologically active substance immobilized stationary phase capable of carrying out measurement excellent in sensitivity and reproducibility while preventing nonspecific adsorption to an immunologically active substance-immobilized stationary phase useful in a two- site method (sandwich measurement) widely used in the field of clinical diagnostic.  
COPYRIGHT: (C)1998, JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-114800

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月6日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

C 0 7 K 17/08

C 0 7 K 17/08

G 0 1 N 33/543

5 2 5

G 0 1 N 33/543

5 2 5 W

// C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 16/00

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平8-271126

(22) 出願日

平成8年(1996)10月14日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(71) 出願人 391012774

中林 宜男

千葉県松戸市小金原5丁目6番20号

(71) 出願人 592057341

石原 一彦

東京都小平市上水本町3-16-37

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74) 代理人 弁理士 酒井 一

最終頁に続く

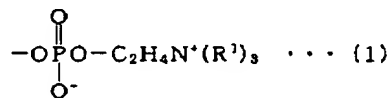
(54) 【発明の名称】 重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相及びその用途

(57) 【要約】

【課題】免疫学的活性物質の測定において、アイソトープ、酵素、蛍光物質、化学発光物質等の標識物質及び測定対象物質に限定されることなく、標識抗体の非特異的吸着、標識抗原の非特異的吸着あるいは検体中の蛋白質の固相への吸着等の蛋白質非特異的吸着を抑制して、優れた精度で目的物質を分析できる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、並びにこの固相を利用した各種方法を提供すること。

【解決手段】担体に免疫学的活性物質を固定化してなる免疫学的活性物質固定化固相に、式(1)(R<sup>1</sup>: C1~10の炭化水素基)で示すホスホリルコリン基含有重合体を吸着させてなる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、並びにこの固相を用いた免疫学的活性物質の測定方法、非特異的吸着の防止方法及び固定化免疫学的活性物質の安定化方法。

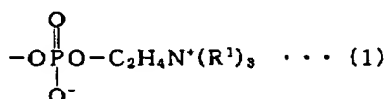
【化1】



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体に免疫学的活性物質を固定化してなる免疫学的活性物質固定化固相に、下記式(1)(式中、 $R^1$ は炭素数1～10の炭化水素基を示す)で表されるホスホリルコリン基含有重合体を吸着させてなる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相。

## 【化1】



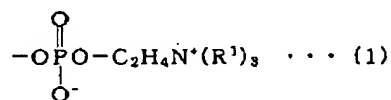
【請求項2】 請求項1記載のホスホリルコリン基含有重合体が、2-メタクリロイルオキシエチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェートを含む重合成分を重合させた重合体である請求項1記載の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相。

【請求項3】 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、免疫学的活性物質固定化固相として、請求項1又は2記載の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法。

【請求項4】 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定において、標識抗体、標識抗原、検体中の蛋白質又はこれらの混合物が免疫学的活性物質固定化固相に非特異的に吸着することを防止するにあたり、免疫学的活性物質固定化固相として、請求項1又は2記載の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることを特徴とする非特異的吸着の防止方法。

【請求項5】 免疫学的活性物質固定化固相に固定化された免疫学的活性物質を安定化させるにあたり、担体に免疫学的活性物質を固定化させた後、下記式(1)(式中、 $R^1$ は炭素数1～10の炭化水素基を示す)で表されるホスホリルコリン基含有重合体を吸着させることを特徴とする固定化免疫学的活性物質の安定化方法。

## 【化2】



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、免疫学的活性物質の測定方法、非特異的吸着の防止方法および固定化免疫学的活性物質の安定化方法に関する。更に詳しくは、臨床試薬等の分野で広く用いられているサンドイッチ法等において、標識抗体の抗体結合固相への吸着(標識抗体の非特異的吸着)、標識抗原の抗原結合固相への吸着(標識抗原の非特異的吸着)あるいは検体中の蛋白質の固相への吸着等の蛋白質が非特異的に吸着することを防止するに適する

重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、さらにはそれを利用した免疫学的活性物質の測定方法、非特異的吸着の防止方法および固定化免疫学的活性物質の安定化方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 臨床診断薬等の分野で広く使用されているイムノメトリックアッセイは、一般的にはtwo-site法(サンドイッチ測定法)による固相法が使われている。この測定方法は、測定すべき物質(被検物質; Ag)のエピトープを異にする2種類の抗体(Ab1, Ab2)を用いる。まず、合成高分子等からなる固相(SP)の表面にAb1を固定した後、これにAgを加えて結合させる。次いで、標識した抗体(Ab2\*)を反応させた後、洗浄して遊離Ab2\*を除去し、固相に結合したAb2\*(結合型, B)の標準活性を測定する。この場合Ag量に応じてBが増加し、両者間に標準曲線が得られる。この標準曲線より検体中の抗原量を測定する。また、抗原と抗体とを逆にして、つまり標識抗原を用いて検体中の抗体量を測定する方法も用いられている(Ag1, Ag2\*およびAbを用いて測定する)。これらの標識物質には、アイソトープ、酵素、蛍光物質あるいは発光物質等が用いられている。

【0003】 これらサンドイッチ法の感度を左右する主な要因の1つは標識抗体の抗体結合固相への非特異的吸着あるいは標識抗原の抗原結合固相への非特異的吸着にある。こうした非特異的吸着は、標識に用いた標識物質の性質に依存し、例えば、酵素標識抗体の非特異的吸着の場合、アルカリフォスファターゼ標識抗体、グルコースオキシダーゼ標識抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体の非特異的吸着は、いずれも加えた量の30000万分の1であり、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗体の非特異的吸着は2000分の1である(医学書院「酵素免疫測定法」第158頁、1989年)。これらの非特異的吸着はサンドイッチ法における感度の低下および再現性の低下を起こしている。

【0004】 従来、これら非特異的吸着を防止するために、次の(1)～(3)の方法が知られている。

(1)イムノアッセイをpH5～6の弱酸性の緩衝液で行なう方法、(2)Ab1を吸着させた後で、固相の余分な蛋白質結合部位を卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清、正常血清等を用いてブロックする方法、(3)有機酸を主成分とする緩衝液に乳蛋白質を溶解し、滅菌処理した非特異的吸着防止剤を用いる方法(特開平01-217266号公報)。しかしながら、(1)の弱酸性での操作や(2)や(3)の各種蛋白質でのブロッキングでは、その蛋白質非特異的吸着防止能は十分ではなく、臨床診断等の分野ではより優れた蛋白質非特異的吸着防止剤の開発および蛋白質非特異的吸着防止処理を施した、免疫学的活性物質固定化固相の開発が望まれている。また、市販の卵白アルブミン、ウシ血清アルブミ

ン、ウシ胎児血清、乳蛋白質等の蛋白質にはしばしば免疫グロブリン、酵素あるいはホルモン等の混入があり、反応に影響をあたえ分析値に誤差を生じさせるため問題となっている。

#### 【0005】

【本発明が解決しようとする課題】本発明の第1の目的は、免疫学的活性物質の測定において、測定系に影響を与えず、つまりアイソトープ、酵素、蛍光物質あるいは化学発光物質等の標識物質および測定対象物質に限定されることなく、標識抗体の抗体結合固相への吸着（標識抗体の非特異的吸着）、標識抗原の抗原結合固相への吸着（標識抗原の非特異的吸着）あるいは検体中の蛋白質の固相への吸着等の蛋白質非特異的吸着を抑制して、優れた精度で目的物質を分析することのできる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を提供することにある。本発明の第2の目的は、蛋白質非特異的吸着を防止し、精度良く目的物質を分析することができる免疫学的活性物質の測定方法を提供することにある。本発明の第3の目的は、免疫学的活性物質を測定するにあたり、蛋白質非特異的吸着を十分に抑制しうる蛋白質非特異的吸着の防止方法を提供することにある。本発明の第4の目的は、免疫学的活性物質固定化固相に固定化された免疫学的活性物質を経時的に安定化しうる固定化免疫学的活性物質の安定化方法を提供することにある。

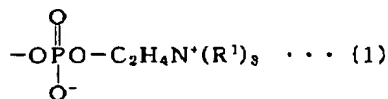
#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、以下の(a)～(d)の発明が提供される。

(a) 担体に免疫学的活性物質を固定化してなる免疫学的活性物質固定化固相に、下記式(1)（式中、R<sup>1</sup>は炭素数1～10の炭化水素基を示す）で表されるホスホリルコリン基含有重合体、好ましくは2-メタクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェートを含む重合成分を重合させた重合体等を吸着させてなる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相。

#### 【0007】

##### 【化3】



【0008】(b) 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、免疫学的活性物質固定化固相として、前記重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法。

(c) 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定において、標識抗体、標識抗原、検体中の蛋白質又はこれらの混合物が免疫学的活性物質固定化固相に非特異的に吸着することを防止するにあたり、免疫学的活性物質固定化固相として、前記重合体吸着免疫学的活性物質固定

化固相を用いることを特徴とする非特異的吸着の防止方法。

(d) 免疫学的活性物質固定化固相に固定化された免疫学的活性物質を安定化させるにあたり、担体に免疫学的活性物質を固定化させた後、前記式(1)で表されるホスホリルコリン基含有重合体を吸着させることを特徴とする固定化免疫学的活性物質の安定化方法。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相において、免疫学的活性物質固定化固相に固定化される免疫学的活性物質、あるいは該固相を用いて抗原抗体反応により免疫学的活性物質を測定する際の測定対象物である免疫学的活性物質は特に限定されるものではないが、例えば次の①～⑦のもの等が挙げられる。

①C反応性蛋白質(CRP)、リウマチ因子(RF)、トランスフェリン等の血漿蛋白質あるいはこれら血漿蛋白質に対する抗体、

②甲状腺刺激ホルモン(TSH)、トリヨードサイロニン(T3)、サイロキシシン(T4)、チロキシシン結合蛋白質(TBG)、サイログロブリン、インスリン、エストリオール(E3)、絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、ヒト胎盤性ラクtoゲン(HPL)等のホルモンあるいはこれらホルモンに対する抗体、

③癌胎児性抗原(CEA)、β<sub>2</sub>-ミクログロブリン、α-フェトプロテイン(AFP)等の腫瘍関連物質あるいはこれら腫瘍関連物質に対する抗体、

④HBS抗原、HBS抗体、HBe抗原、HBe抗体等のウイルス肝炎の抗原または抗体あるいは、これらウイルス肝炎の抗原または抗体に対する抗体または抗原、

⑤ムンプス、ヘルペス、麻疹、風疹、サイトメガロ等のウイルス、抗エイズ抗体等の各種生体成分に対する抗体または抗原、

⑥フェノバルビタール、アセトアミノフェノン、サリチル酸、シクロスポリン等の各種薬剤に対する抗体、

⑦酵素あるいは酵素に対する抗体。

なお、固定化される抗体に対する抗原、または固定化される抗原に対する抗体が、測定対象の免疫学的活性物質（被検物質）として使用できる。

【0010】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相において、担体の材質及び形状は特に限定されるものではないが、例えば材質としては、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、(メタ)アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成樹脂；ニトロセルロース、セルロース、メチルセルロース等のセルロース誘導体；金属、セラミック、ガラス、シリコンラバー等の無機物を挙げることができる。また、形状としては、例えば、試験管状、タイタープレート状、ラテックス状、フィルター状、フィルム状、微粒子状等を挙げることができる。

【0011】本発明において、免疫学的活性物質固定化固相に吸着させるホスホリルコリン（以下、PCと略す）基含有重合体は、前記式（1）で示されるPC基を有する重合体であって、PC基を有する単量体を含む重合成分を重合させた重合体である。PC基を有する単量体としては、例えば、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリエチルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリプロピルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリブチルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリオクチルアンモニオ）エチルホスフェート等が挙げられる。特に入手性等の点から、2-メタクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェート {=2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下、MPCと略す）} が好ましく挙げられる。本発明で用いるPC基含有重合体は、PC基を有する単量体の単重合体であっても、PC基を有する単量体と他の共重合可能なビニル単量体との共重合体でもよい。PC基含有重合体中のPC基含有割合は、PC基含有重合体に対し、1~100モル%が好ましく、特に5~10モル%が好ましい。含有割合が1モル%未満の場合には、非特異的吸着を防止することが困難になるので好ましくない。またPC基含有重合体は、重合温度、重合開始剤使用量、重合度調整剤の使用等によっても異なるが、好ましくは数平均分子量（ $M_n$ ）1,000~1,000,000、特に好ましくは2,000~500,000の重合体である。

【0012】前記PC基を有する単量体と共重合可能な他のビニル単量体としては、例えば、（メタ）アクリル酸メチル、（メタ）アクリル酸エチル、（メタ）アクリル酸-n-ブチル、（メタ）アクリル酸イソブチル、（メタ）アクリル酸ペンチル、（メタ）アクリル酸ヘキシル、（メタ）アクリル酸ヘプチル、（メタ）アクリル酸オクチル、（メタ）アクリル酸トリデシル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等の（メタ）アクリル酸エステル；（メタ）アクリレート；スチレン、 $\alpha$ -メチルスチレン、メチル核置換スチレン、クロロ核置換スチレン等のスチレン系単量体；塩化ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、プロピレン、イソブチレン等の置換、もしくは無置換炭化水素系単量体、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体；エチルビニルエーテル、n-ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；ジエチルイタコネート、ジ-n-ブチルイタコネート等が挙げられる。特に好ましくは、メタクリル酸エステル、スチレン等を好ましく挙げることができる。

【0013】PC基含有重合体を調製するには、前述の

PC基を有する単量体を含む重合成分を、例えば重合開始剤を用いたラジカル重合等の通常の重合方法により重合させることにより得ることができる。

【0014】重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤であれば特に限定されず、例えば2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、過酸化ベンゾイル、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、 $t$ -ブチルペルオキシ-2-エチルヘキサノエート、 $t$ -ブチルペルオキシビバレート、 $t$ -ブチルペルオキシジイソブチレート、過硫酸塩、過硫酸-亜硫酸水素塩等が挙げられる。重合開始剤の使用量は、用いる全単量体100重量部に対して0.01~10重量部が好ましく、特に好ましくは0.1~5重量部である。

【0015】重合条件は、好ましくは30~80℃、特に好ましくは40~70℃において2~72時間重合させるのが望ましい。この際、重合反応をより円滑に行なうために溶媒を用いてもよく、該溶媒としては、水、メタノール、エタノール、プロパノール、 $t$ -ブタノール、ベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、クロロホルムおよびこれらの混合物等を挙げることができる。

【0016】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を調製するには、前記担体に免疫学的活性物質を、例えばインキュベート等により固定化させた免疫学的活性物質固定化固相に、前記PC基含有重合体を含む溶液を添加等して、PC基含有重合体を吸着させる方法等によりえることができる。PC基含有重合体を含む溶液は、懸濁液であつても溶液であつてもよく、好ましくはリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、各種生理食塩水等の溶解液あるいは懸濁液が挙げられる。これらの液にジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド等の有機溶媒を0.01~20重量%添加することもできる。特に好ましくはリン酸緩衝液、各種生理食塩水等の溶解液が挙げられる。PC基含有重合体を含む溶液中のPC基含有重合体の濃度は、好ましくは0.00001~10重量%であり、特に、蛋白質の固相への非特異的吸着を防止し、且つ固定化免疫学的活性物質の安定化能を著しく向上させようように、0.0001~5重量%が好ましい。PC基含有重合体を免疫学的活性物質固定化固相に吸着させるには、担体表面に免疫学的活性物質を結合させた後、前記PC基含有重合体を含む溶液を添加してそのまま保持あるいは、添加後にある所定の時間インキュベートし、続いて残存のPC基含有重合体を含む溶液を除去することにより行うことができる。PC基含有重合体を含む溶液を添加してから除去するまでのインキュベート時間は、PC基含有重合体を含む溶液の濃度あるいはインキュベート温度等にもよるが、1分間~72時間が好ましい。特に、抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、蛋白質の固相への非特異的吸

着を十分に防止する効果を付与し、また固相化された免疫学的活性物質の安定化効果を向上させるために、30分間～48時間が好ましい。インキュベーション時間が1分未満では、所望の効果が得られない恐れがある。インキュベーション温度は、好ましくは0～55℃、特に、固定化免疫学的活性物質の免疫学的活性に影響のない、4～40℃が好ましい。PC基含有重合体の固相への吸着量は、特に限定されるものではないが、好ましくは10ng/48ウェル～10000ng/48ウェル、特に好ましくは、固定化免疫学的活性物質の安定化に寄与し、添加する重合体溶液の粘性も低く扱い易い、100ng/48ウェル～1000ng/48ウェルが挙げられる。10ng/48ウェル未満では、固定化免疫学的活性物質の安定化が不十分になる恐れがあり、10000ng/48ウェルを超えると、添加する重合体溶液の濃度を高くするか、或いは重合体溶液を添加してから除去するまでの時間を長くする必要がある。重合体溶液の濃度を高くすると粘性も高くなり扱い難くなり、時間を長くすると迅速な測定が困難になり好ましくない。

【0017】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相は、PC基含有重合体が吸着されているので、保存時の固定化された免疫学的活性物質の安定性が良好である。このようにして調製された重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の保存方法は特に限定されないが、好ましくは、そのまま放置、密封、凍結、あるいは凍結乾燥後に密封等が挙げられ、特に好ましくは、固定化免疫学的活性物質の安定化効果を更に向上させるために、密封あるいは凍結乾燥後に密封して保存するのが望ましい。

【0018】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相は、あらゆる分野、方法で利用可能であり、例えば臨床検査、免疫学、生化学、分子生物学等の研究分野で利用可能であり、特に、酵素免疫測定法(ELISA)、放射線免疫測定法(RIA)、あるいはウェスタンブロットング法等の免疫学的測定方法に多用することができる。

【0019】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の具体的な調製方法及び、抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質測定方法を、例えば、担体としてポリスチレン製タイタープレートを用いた場合について以下に説明する。

【0020】(1)まず最初に、測定対象物と特異的に反応する抗体を含む溶液をポリスチレン製タイタープレートに加え、4℃、12時間等の所望条件でインキュベートした後、生理食塩水で数回洗浄し、免疫学的活性物質固定化固相を調製する。

(2)次に、MPC重合体等のPC基含有重合体を0.01重量%含む溶液を前記免疫学的活性物質固定化固相に添加し、4℃、12時間等の所望条件でインキュベートした後、PC基含有重合体を含む溶液を除去し、重合体

吸着免疫学的活性物質固定化固相を調製する。

(3)続いて、濃度が既知の測定対象物を含む溶液(スタンダード溶液)と、未知量の測定対象物を含む溶液(検体)とを各々別に加え、25℃、2時間等の所定条件でインキュベートして、固定化免疫学的活性物質と測定対象物とを抗原抗体反応させることにより、固定化免疫学的活性物質-測定対象物複合体を形成させ、その後、生理食塩水で数回洗浄する。

(4)測定対象物と特異的に反応する酵素標識抗体を含む溶液を加え、25℃、2時間等の所望条件でインキュベートして、測定対象物と酵素標識抗体とを抗原抗体反応させることにより、固定化免疫学的活性物質-測定対象物-酵素標識抗体複合体を形成させ、その後、生理食塩水で数回洗浄する。

(5)固定化免疫学的活性物質-測定対象物-酵素標識抗体複合体の酵素活性を測定し、検体での酵素活性をスタンダード溶液での酵素活性と比較することにより、検体中の測定対象物量を求めることができる。このような測定方法において、PC基含有重合体が吸着された重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることにより、蛋白質の固相への非特異的吸着が防止される。

#### 【0021】

【発明の効果】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相は、酵素、ホルモン等の混入がないPC基含有重合体が吸着されているので、抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、蛋白質の非特異的吸着が低い。また、固定化された免疫学的活性物質が長期間安定であり、高感度で精度の高い分析の実施が可能となる。

#### 【0022】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

#### 合成例1：MPC重合体の合成

総単量体濃度が1.0mol/lおよび重合開始剤量が単量体に対して1mol%となるように、MPC5.905g(0.02mol)を重合用ガラス反応管に秤取し、これに重合開始剤として2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(以下AIBNと略す)0.0328g(0.2mmol)、並びに重合溶媒としてメタノール20mlを加えた。反応管内を十分にアルゴン置換した後、密封した。次いで、24時間、50℃に加温することにより重合反応を行なった。反応混合物を氷冷した後、400mlのジエチルエーテルに滴下することにより重合物を沈澱させた。沈澱物を濾別し、十分にジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥して白色粉末状の重合物(重合体Aと称す)を3.691g得た。重合体の収率は62.5%であった。分子量は重合物のリン酸緩衝溶液液をGPC(ゲルパーミエーションクロマトグラフィ)を用いて分析することにより測定した結果、ポリエチレングリコール換算で68000であった。

【0023】合成例2：MPC-メタクリル酸-n-ブチル（以下BMAと略す）共重合体の合成

MPCとBMAとのモノマー仕込みモル比がMPC/BMA=40/60、総単量体濃度が1.0mol/l、並びに重合開始剤量が単量体に対して1mol%となるように、MPC1.435g(4.9mmol)、BMA2.153g(15.1mmol)を重合用ガラス反応管に秤取し、これに重合開始剤としてAIBN0.0328g(0.2mmol)、並びに重合溶媒としてメタノール20mlを加えた。反応管内を充分にアルゴン置換した後、密封した。次いで、24時間、60℃に加温することにより、重合反応を行なった。反応混合物を氷冷した後、400mlのジエチルエーテルに滴下することにより重合物を沈澱させた。沈澱物を濾別し、十分にジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥して白色粉末状の重合物（以下重合体Bと称す）を2.019g得た。重合体の収率は、65.3%であった。分子量は重合物のテトラヒドロフラン溶液をGPCを用いて分析することにより測定した結果、ポリスチレン換算で32000であった。モル組成比は元素分析の結果より、MPC/BMA=38.5/61.5であった。

【0024】合成例3

BMAの代わりにメチルメタクリレート（MMAと略す）を用い、合成例2に準じて共重合体（以下重合体Cと称す）を合成した。得られた共重合体のモル組成および分子量は、MPC/MMA=34.4/65.6、 $M_n=69000$ であった。

【0025】合成例4

BMAの代わりにスチレン（以下Stと略す）を用い、合成例2に準じて共重合体（重合体Dとする）を合成した。得られた共重合体のモル組成および分子量は、MPC/St=38.5/61.5、 $M_n=26000$ であった。

【0026】合成例5

BMAの代わりに2-ヒドロキシエチルメチルメタクリレート（以下HEMAと略す）を用い、合成例2に準じて共重合体（以下重合体Eと称す）を合成した。得られた共重合体のモル組成および分子量は、MPC/HEMA=21.5/78.5、 $M_n=32000$ であった。

【0027】合成例1～5に用いた単量体、得られた共重合体の重合体の収率、モル組成及び分子量を表1に示す。

【0028】

【表1】

	合 成 例				
	1	2	3	4	5
式(I)の基含有単量体	MPC	MPC	MPC	MPC	MPC
その他の単量体	-	BMA	MMA	St	HEMA
仕込みモル比					
MPC/その他の単量体	100/0	40/60	40/60	40/60	40/60
重合体の収率(%)	62.5	65.3	66.0	63.5	66.0
数平均分子量	68000	32000	69000	26000	32000
重合モル比					
MPC/その他の単量体	100/0	38.5/61.5	34.4/65.6	38.5/61.5	21.5/78.5

【0029】実施例1-1：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

10 $\mu$ l/mlの抗マウス抗体生理食塩水溶液（和光純薬工業（株）製）をポリスチレン製タイタプレートに100 $\mu$ l/ウェルで加え、4℃、一晚インキュベートして物理的に吸着させた後に、生理食塩水溶液で4回洗浄を行った。次いで、合成例2で合成した重合体B0.001重量%添加した生理食塩水溶液を300 $\mu$ l/ウェルで加え、4℃、一晚インキュベートした後に、共重合体溶液を除去し、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を調製した。吸着により固定化された抗マウス抗体量は、ポリスチレン製タイタプレートの10ウェルに200 $\mu$ lの1%-ドデシル硫酸ナトリウムを含む生理食塩水を各々添加して、固定化抗マウス抗体を剥離させた後、PIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Kit」を用いて測定した。測定結果を表2に示す。また、吸着した重合体量は、48ウェルを用いて和光純薬工業（株）製の商品名「リン脂質B-テストワコー」を用いて測定した。測定

結果を表3に示す。

【0030】実施例1-2及び1-3：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

合成例2で合成した重合体Bの代わりに、合成例3及び4で合成した重合体C及びDを用いた以外は実施例1-1と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得、各測定を行った。結果を表2及び表3に示す。

【0031】比較例1-1

合成例2で合成した重合体Bの代わりに、1重量%のウシ血清アルブミンを用いた以外は実施例1-1と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得た。吸着により固定化された抗マウス抗体量は、実施例1-1と同様に、吸着したウシ血清アルブミン量は、抗マウス抗体量を測定するのと同様に、10ウェルに200 $\mu$ lの1%-ドデシル硫酸ナトリウムを含む生理食塩水を各々添加して、固定化抗マウス抗体及びウシ血清アルブミンを剥離させた後、PIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Kit」を用いて吸着蛋白質量を求め、その値から固定化された抗マ

ウス抗体量を差し引くことにより求めた。結果を表2及び表3に示す。

#### 【0032】実施例1-4：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

ガラス試験管（径；12mm、高さ；75mm）に3-アミノプロピルトリエトキシシランを0.5mlを加え、室温で20分間インキュベートした後に、生理食塩水で4回洗浄した。次に、2.5重量%-グルタルアルデヒドを含む生理食塩水を0.5ml加え、室温で2時間インキュベートした後に、生理食塩水で2回洗浄した。次に、10 $\mu$ l/mlの抗マウス抗体（和光純薬工業（株）製の生理食塩水溶液を0.5ml加え、室温で2時間インキュベートした後に、生理食塩水溶液で4回洗浄を行った。次いで合成例1で合成した重合体Aを0.01重量%添加した生理食塩水溶液を1ml加え、室温で30分間インキュベートした後に、重合体溶液を除去し、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得た。固定化された抗マウス抗体量は、未反応の抗マウス抗体を、PIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Kit」を用いて測定し、添加した全抗マウス抗体量と未反応の抗マウス抗

体量との差から求めた。測定結果を表2に示す。また、吸着したMPC重合体量は、試験管20本を用いて和光純薬工業（株）製の商品名「リン脂質B-テストワコー」を用いて測定した。測定結果を表3に示す。

#### 【0033】実施例1-5：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

実施例1-4で用いた重合体Aの代わりに、合成例5で合成した重合体Eを用いた以外は実施例1-4と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得、各測定を行った。測定結果を表2及び表3に示す。

#### 【0034】比較例1-2

実施例1-4で用いた重合体Aの代わりに、1重量%のウシ血清アルブミンを用いた以外は実施例1-4と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得た。固定化された抗マウス抗体量は実施例1-4と同様に、ウシ血清アルブミン量は、添加したウシ血清アルブミン量と未吸着のウシ血清アルブミン量との差から求めた。測定結果を表2及び表3に示す。

#### 【0035】

#### 【表2】

実 施 例			比較例	実 施 例			比較例
1-1	1-2	1-3	1-1	1-4	1-5	1-2	1-2
2.6	2.6	2.6	2.6	2.1	2.1	2.1	2.1

注1)：実施例1-1～1-3及び比較例1-1の単位は $\mu$ g/ $\text{cm}^2 \cdot 10$ ウェル（10ウェル分の単位 $\text{cm}^2$ 当たりの固定化量）

注2)：実施例1-4、1-5及び比較例1-2の単位は $\mu$ g/ $\text{cm}^2 \cdot 10$ 本（試験管10本分の単位 $\text{cm}^2$ 当たりの固定化量）

#### 【0036】

#### 【表3】

実 施 例			比較例	実 施 例			比較例
1-1	1-2	1-3	1-1	1-4	1-5	1-2	1-2
765	762	760	600	610	600	610	610

単位はng/48ウェル

【0037】実施例2-1～2-3：測定対象物の測定  
実施例1-1、実施例1-2及び実施例1-3で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相に、0 $\mu$ g/ml、0.05 $\mu$ g/ml、0.1 $\mu$ g/ml、0.2 $\mu$ g/ml、0.4 $\mu$ g/ml、0.8 $\mu$ g/mlの各濃度のマウス抗体（和光純薬工業（株）製の生理食塩水溶液を100 $\mu$ l/ウェル添加した後、25 $^{\circ}$ C、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体（和光純薬工業（株）製）を生理食塩水で10000倍に希釈して、100 $\mu$ l/ウェル添加した後、25 $^{\circ}$ C、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、和光純薬工業（株）製の商品名「OPD錠」（o-フェニレンジアミン）1錠を0.006重量%の過酸化水素を含むリン酸/クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液を、50 $\mu$ l/ウェル添加した後、25 $^{\circ}$ C、10分間インキュベートし、続いて2Nの硫酸溶液を100 $\mu$ l/ウェル加えた後に、東ソー社製のマ

イクロプレートリーダー「MPR-A41」（商品名）を用いて、各ウェルの492nmの吸光度を測定した。測定個数（n）は8で、平均値、標準偏差及び、CV値（%）{（平均値/標準偏差） $\times$ 100}を表4に示す。

#### 【0038】実施例2-4及び2-5：測定対象物の測定

実施例1-4及び実施例1-5で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相に、0 $\mu$ g/ml、0.05 $\mu$ g/ml、0.1 $\mu$ g/ml、0.2 $\mu$ g/ml、0.4 $\mu$ g/ml、0.8 $\mu$ g/mlの各濃度のマウス抗体生理食塩水溶液（和光純薬工業（株）製）0.5mlを試験管に添加した後、25 $^{\circ}$ C、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体（和光純薬工業（株）製）を生理食塩水で20000倍に希釈し、0.5ml試験管に添加した後、25 $^{\circ}$ C、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、和



光純薬工業(株)製の商品名「OPD錠」1錠を0.02%の過酸化水素を含むリン酸/クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液0.5mlを試験管に添加した後、25℃、10分間インキュベートした。続いて、2Nの硫酸溶液0.5mlを試験管に添加した後に、日本分光社製分光光度計、商品名「Ubest-50」を用いて、各試験管の492nmの吸光度を測定した。測定個数(n)は5で、平均値、標準偏差及び、CV値(%)を表4に示す。

#### 【0039】比較例2-1

実施例2-1で用いた、実施例1-1で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1

10 【0041】

【表4】

抗体 量 μg /ml	実 施 例														
	2-1			2-2			2-3			2-4			2-5		
	吸光度	標準 偏差	CV (%)	吸光度	標準 偏差	CV (%)	吸光度	標準 偏差	CV (%)	吸光度	標準 偏差	CV (%)	吸光度	標準 偏差	CV (%)
0.00	0.050	0.0042	8.4	0.048	0.0042	8.8	0.049	0.0039	8.0	0.033	0.0012	3.6	0.029	0.0018	6.2
0.05	0.510	0.0408	8.0	0.485	0.0398	8.2	0.497	0.0397	8.0	0.235	0.0128	5.5	0.254	0.0162	6.4
0.10	0.789	0.0564	7.1	0.750	0.0458	6.1	0.769	0.0615	8.0	0.363	0.0191	5.3	0.426	0.0276	6.5
0.20	1.206	0.0732	6.1	1.146	0.0696	6.1	1.176	0.0945	8.0	0.555	0.0382	6.9	0.641	0.0416	5.5
0.40	1.604	0.0945	5.9	1.524	0.0876	5.7	1.564	0.1268	8.1	0.738	0.0527	7.1	0.839	0.0627	6.3
0.80	1.812	0.0984	5.4	1.721	0.0993	5.8	1.767	0.1234	7.0	0.834	0.0533	6.4	0.958	0.0693	6.2

#### 【0042】

【表5】

抗体 量 μg /ml	比 較 例					
	2-1			2-2		
	吸光度	標準 偏差	CV (%)	吸光度	標準 偏差	CV (%)
0.00	0.393	0.0412	10.5	0.197	0.0310	15.8
0.05	0.486	0.0486	10.0	0.243	0.0231	9.5
0.10	0.575	0.0687	11.9	0.288	0.0252	8.8
0.20	1.096	0.0946	8.6	0.548	0.0438	8.0
0.40	1.534	0.0625	4.1	0.767	0.0328	4.3
0.80	1.747	0.0804	4.6	0.747	0.0351	4.0

#### 【0043】実施例3-1～3-3：安定性試験

実施例1-1、実施例1-2及び、実施例1-3で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相をアルミラミネートポリエチレン袋に密封した後に、40℃で保存した。0日後(試験開始日)、1週間後、2週間後、3週間後及び、4週間後に、1μg/mlのマウス抗体生理食塩水溶液を50μl/ウェル添加し、25℃、2時間インキュベートした後、生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体(和光純薬工業(株)製)を生理食塩水で10000倍に希釈し、100μl/ウェル添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次に和光純薬工業(株)製の商品名「OPD錠」1錠を0.006%の過酸化水素を含むリン酸/クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液を、100μl/ウェル添加した後、25℃、10分間インキュベートした。次いで、2Nの硫酸溶液を100μl/ウェル加えた後

14  
-1で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以外は実施例2-1と同様に行い、各測定を行った。測定結果を表5に示す。

#### 【0040】比較例2-2

実施例2-4で用いた、実施例1-4で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1-2で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以外は実施例2-4と同様に行い、各測定を行った。測定結果を表5に示す。

に、東ソー社製マイクロプレートリーダー「MPR-A41」(商品名)を用いて、各ウェルの492nmの吸光度を測定し、0日後の吸光度を100%として、各週間後の%を求めた。測定結果を表6に示す。

#### 【0044】実施例3-4及び3-5：安定性試験

30 実施例1-4及び実施例1-5で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を密封した後に、40℃で保存した。0日後(試験開始日)、1週間後、2週間後、3週間後及び4週間後に、1μg/mlのマウス抗体生理食塩水溶液(和光純薬工業(株)製)0.5mlを試験管に添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体(和光純薬工業(株)製)を生理食塩水で20000倍に希釈し、0.5mlを試験管に添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて、生理食塩水で4回洗浄した。和光純薬工業(株)製の商品名「OPD錠」1錠を0.006%の過酸化水素を含むリン酸/クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液0.5mlを試験管に添加した後、25℃、10分間インキュベートして、2Nの硫酸溶液0.5mlを試験管に添加した後、日本分光社製分光光度計、商品名「Ubest-50」を用いて、各試験管の492nmの吸光度を測定し、0日後の吸光度を100%として、各週間後の%を求めた。測定結果を表6に示す。

#### 【0045】比較例3-1

50 実施例3-1で用いた、実施例1-1で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1-1で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以

外は実施例3-1と同様に測定を行った。測定結果を表6に示す。

【0046】比較例3-2

実施例3-4で用いた、実施例1-4で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1

-2で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以外は実施例3-4と同様に測定を行った。測定結果を表6に示す。

【0047】

【表6】

	実 施 例					比 較 例	
	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-1	3-2
0日後	100	100	100	100	100	100	100
1週間後	100	102.2	99.8	101.5	100.9	95.4	93.2
2週間後	98.6	99.8	102.2	109.4	99.1	82.3	81.9
3週間後	104.2	103.6	98.6	99.6	103.5	64.3	62.8
4週間後	99.6	103.6	105.2	105.2	98.6	41.9	38.2

【0048】以上の結果、本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることにより、表2の結果から、固定化固相に抗マウス抗体が固定化されていることが判り、また表3の結果から、その後吸着された、本発明の重合体及び比較例のBSAが量600～765ng

／48ウェル吸着されていることが判る。更に、表4及び表5の結果から、より低濃度の抗体量でも、感度良く測定が可能であること、また、表6より、本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の場合、固定化された免疫学的活性物質の安定性が優れていることが判る。

フロントページの続き

(72)発明者 榊 秀次郎

茨城県つくば市春日2-20-3

(72)発明者 首藤 健志郎

茨城県つくば市花畑3-7-1

(72)発明者 山田 智

茨城県つくば市春日2-20-3

(72)発明者 松山 一夫

茨城県つくば市春日2-17-14

(72)発明者 中林 宣男

千葉県松戸市小金原5-6-20

(72)発明者 石原 一彦

東京都小平市上水本町3-16-37